



TITLE:

# 脊椎動物におけるSRP RNAの核外輸送の研究( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

竹岩, 俊彦

---

CITATION:

竹岩, 俊彦. 脊椎動物におけるSRP RNAの核外輸送の研究. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18834>

RIGHT:

許諾条件により本文は2015/05/01に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博 士（理 学）	氏名	竹岩 俊彦
論文題目	脊椎動物における SRP RNA の核外輸送の研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>真核細胞では、核内において様々な RNA が転写されており、その多くが転写後に核膜孔を通過して細胞質へと輸送される。過去の研究から、RNA が細胞質へと輸送されるためには核外輸送とよばれるタンパク質と複合体を形成する必要があることが示されている。さらに、RNA はそれぞれに特異的な核外輸送によって細胞質へと輸送されることが明らかにされている。現在までに多くの RNA の核外輸送について研究が行われ、その分子機構が解明されつつある一方で、本研究の研究対象である SRP RNA の核外輸送については、特に脊椎動物において、研究が立ち遅れていた。SRP RNA は、真核細胞において、膜タンパク質や分泌タンパク質を小胞体へとリクルートする RNA-タンパク質複合体であるシグナル認識粒子(Signal Recognition Particle: SRP)の RNA 成分である。出芽酵母において、SRP RNA は CRM1 とよばれる核外輸送因子により輸送されることが示されている。一方で、脊椎動物においても、ラットの培養細胞を CRM1 の阻害剤で処理すると SRP RNA が核に蓄積することから、出芽酵母と同様に CRM1 が SRP RNA を輸送すると予想されていた。しかしながら上述のラットの培養細胞を用いた実験において、CRM1 阻害の間接的な影響により SRP RNA が核に蓄積した可能性は排除できず、CRM1 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかは不明瞭であった。そのため、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構は、核外輸送因子の実体からして、ほとんど未知の状態にあった。そこで、申請者は脊椎動物における SRP RNA の核外輸送機構の解明を目的として研究を開始した。まず脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存しているかどうか、RNA 輸送研究においてよく用いられるアフリカツメガエル卵母細胞への微量注入系を用いて解析した。</p> <p>その結果、脊椎動物において SRP RNA の核外輸送が CRM1 に依存していないことを見出した。次に、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子を同定するために、様々な RNA を用いた cross-competition assay を行った。その結果、SRP RNA は pre-miRNA や tRNA と共通した因子により輸送されることが示唆された。そのため、pre-miRNA や tRNA の核外輸送因子である Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子の候補として浮上した。そこで、Exportin-5 が SRP RNA の核外輸送因子であるかどうかを調べるために、以下の実験を行った。まず、Exportin-5 のリコンビナントタンパク質または Exportin-5 に対する抗体を卵母細胞の核に注入して SRP RNA の核外輸送に与える影響を調べた。その結果、リコンビナントタンパク質の注入により SRP RNA の輸送は促進される一方、抗体の注入により SRP RNA の輸送は阻害された。次に、ビオチン化した SRP RNA を HeLa 細胞核抽出液と混和後にプルダウンする実験を行った。その結果、Exportin-5 が輸送基質と結合するために必要とする cofactor である RanGTP の存在下において CRM1 ではなく Exportin-5 が沈降したことから、SRP RNA は Exportin-5 と相互作用することが示唆された。以上の結果から、脊椎動物における SRP RNA の核外輸送因子は Exportin-5 であることが示唆された。</p> <p>本研究の結果をうけて、Exportin-5 がどのようにして SRP RNA を認識するのか、なぜ出芽酵母と脊椎動物で SRP RNA の核外輸送因子が異なるのかといった問題が新たに浮上した。これらに関して本論文の最後に考察を行った。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

シグナル認識粒子(Signal Recognition Particle: SRP)は、膜タンパク質や分泌タンパク質を小胞体へとリクルートする RNA-タンパク質複合体である。その機能については過去に多くの研究がなされたが、その生合成過程についての研究は大きく遅れていた。特に、SRP の RNA 成分である SRP RNA の核外輸送過程については情報が不足していた。出芽酵母では、核外輸送因子 CRM1の温度感受性変異株において、制限温度下で SRP RNA が核に蓄積することから、この生物種では CRM1が SRP RNA の輸送因子であると結論されていた。しかし、この遺伝学的データを補完するような、CRM1と SRP RNA の結合など生化学的なデータは全く欠如していた。

一方、ラット培養細胞を CRM1の阻害剤である LMB で処理すると、SRP RNA の核小体内への蓄積が見られることから、脊椎動物においても CRM1が核外輸送因子であるとの考えが定着しつつあった。この場合も CRM1と SRP RNA の結合などの生化学的なデータは全く欠如していた。さらに問題であったのは、LMB を非常に長時間(20時間)処理しないと SRP RNA の蓄積が見られないことであった。LMB の長時間処理では、2次的、3次的な影響が出てきてしまい、結果の解釈が困難であることは、過去の文献から明らかであった。つまり、脊椎動物の SRP RNA の核外輸送機構については、しっかりとした信頼のおける研究手法を用いてメスを入れなおす必要があった。

申請者は、輸送分野などで多くの実績があるアフリカツメガエル卵母細胞の核外輸送系を用いて、交差競合実験、組換え体タンパク質注入実験、抗体注入実験などにより、脊椎動物では、SRP RNA の核外輸送因子は、CRM1ではなく Exportin-5であることを突き止めた。さらに、今までの研究には欠けていた、生化学的なデータも付け加え、結論を確かなものにした。

以上のように、申請者は脊椎動物の SRP RNA の核外輸送因子を明らかにし、シグナル認識粒子の生合成過程の理解に大きく貢献した。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成27年1月14日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行い、その結果合格と認めた。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降